

敖维平,张 蕾,周东年,等.不同菌株发酵降解棉粕蛋白质的特性[J].江苏农业科学,2016,44(1):366-368.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.106

# 不同菌株发酵降解棉粕蛋白质的特性

敖维平<sup>1,2</sup>,张 蕾<sup>1</sup>,周东年<sup>1</sup>,盛 鹤<sup>1</sup>

(1.塔里木大学动物科学学院,新疆阿拉尔 843300;2.新疆生产建设兵团畜牧科技重点实验室,新疆阿拉尔 843300)

**摘要:**为筛选降解棉籽粕大分子蛋白有效菌株,试验选用假丝酵母菌(1 630)、米曲霉(2 174)、黑曲霉(2 377)、混合菌(假丝酵母菌:米曲霉:黑曲霉=1:1:1)进行棉籽粕灭菌和未灭菌固体发酵。分别采用微量凯氏定氮法、甲醛滴定法测定棉籽粕发酵产品的酸溶蛋白氮、游离氨基氮,比较棉籽粕发酵产品的小分子肽氮含量、小分子肽氮提高率。结果表明,选用3株标准菌种及其混合菌液对棉粕发酵处理均可降解大分子棉蛋白,且混合菌株发酵表现出“协作效应”;由反映发酵棉蛋白特性的酸溶蛋白总氮、游离氨基氮、小肽含量可知,单菌株及混合菌株发酵处理时间以48 h为宜。

**关键词:**棉籽粕;酸溶蛋白氮;游离氨基氮;小分子肽氮

**中图分类号:** S816.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0366-03

棉粕是我国饲料工业中一种重要的蛋白质原料,常年生产量超过600万t,粗蛋白含量仅低于豆粕,但棉粕含游离棉酚、蛋白质品质差等不利因素限制了其在畜牧生产中的应用<sup>[1]</sup>。对棉籽粕的开发利用中不仅要降低棉粕游离棉酚,提高棉粕蛋白质品质也极为重要。国内外学者采用有效菌种发酵改良棉粕营养特性,并取得了一定进展<sup>[2-6]</sup>,发酵降低棉粕游离棉酚的研究较多,而关于发酵后棉粕蛋白质品质改良的研究仍有待深入。随着动物营养研究的深入开展,小肽营养逐渐成为动物营养的研究热点,利用低质饲料蛋白原料生产小分子营养肽备受关注,发酵法也成为降低蛋白分子质量、提高棉蛋白品质的有效方法。本研究选用黑曲霉、假丝酵母菌、米曲霉、混合菌液固体发酵降解棉粕,并分析棉粕发酵降解后的蛋白质组成特性,以期对棉粕在畜牧业生产中的合理利用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

棉籽粕购自新疆维吾尔自治区阿拉尔市某油脂厂,经粉碎过40目筛,作为发酵基础原料。假丝酵母菌(1 630)、米曲霉(2 174)、黑曲霉(2 377)标准菌种均购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。PDA液体培养基配方为:马铃薯200 g/L、蔗糖20 g/L,pH值自然;LB液体培养基配方为:酵母膏5 g/L、蛋白胨10 g/L、NaCl 5 g/L,pH值7.0。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 种子液的制备** 取超低温保存的菌种置于37℃使其解冻,挑取菌落并接种于液体培养基中,置于37℃使其复活,取复活的菌落进行2次以上斜面培养,获得斜面菌种。

假丝酵母菌:取1环活化并经培养的斜面菌种接于LB

液体培养基中,于37℃、200 r/min摇床培养12 h后,取2 mL转接至另一LB液体培养基,并于37℃、200 r/min摇床培养12 h作为种子液。黑曲霉与米曲霉:取1环斜面菌种接于放有20颗玻璃珠的PDA液体培养基中,于30℃、200 r/min摇床培养24 h后,取2 mL转接至另一PDA液体培养基,并于30℃、200 r/min摇床培养24 h作为发酵种子液。

**1.2.2 棉籽粕发酵处理** 称取棉粕50 g置于500 mL三角瓶,按料水比1 g:1 mL充分搅匀,置于121℃高温高压灭菌30 min。试验发酵分为未灭菌发酵、灭菌发酵,分别接种酵母菌、黑曲霉、米曲霉、混后菌(酵母菌:黑曲霉:米曲霉=1:1:1),接种量均为100 g/L,对照组(0 h)以重蒸水代替菌液,分别于发酵24、48、72 h时取样,置于60℃烘箱12 h后,粉碎并过60目筛,置于4℃冰箱保存备用。

**1.2.3 指标测定** 称取过60目筛的发酵棉籽粉5 g,加入70 mL水并于恒温振荡器振荡3 h,加入20 mL体积分数为10%的三氯乙酸,过滤并用体积分数为10%的三氯乙酸定容至100 mL,将滤液于4 000 r/min离心10 min,取上清液作为测定分析样品。

发酵前棉粕蛋白氮、发酵棉粕酸溶蛋白总氮均采用凯氏定氮法测定;游离氨基氮采用甲醛滴定法测定。

小分子肽氮含量(mg/g,占干基)<sup>[7]</sup>:酸溶蛋白氮与游离氨基氮之差。

小分子肽氮提高率=(发酵后小肽氮-发酵前小肽氮)×100%÷发酵前小肽氮。

### 1.3 数据分析

采用Excel 2007软件进行数据整理,采用DPS软件进行完全随机单因素分析,采用LSD软件进行多重比较,数据以“平均值±标准差”表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 黑曲霉发酵前后棉籽粕产品的蛋白质特性

由黑曲霉发酵前后棉籽粕产品的蛋白质特性(表1)可知,发酵处理棉籽粕后,酸溶蛋白总氮、小肽氮含量、小肽氮提高率均高于发酵前,且发酵48 h时小肽氮含量均达到最大

收稿日期:2015-08-25

基金项目:塔里木大学校长硕士基金(编号:TDZKSS201306)。

作者简介:敖维平(1972—),男,新疆阿拉尔人,硕士,副教授,主要从事单胃动物营养与饲料开发利用研究。E-mail:awp3322@126.com。

表 1 黑曲霉发酵前后棉籽粕蛋白质特性

灭菌与否	时间 (h)	酸溶蛋白总氮 (mg/g)	游离氨基氮 (mg/g)	小肽氮含量 (mg/g)	小肽氮提高率 (%)
灭菌	0	5.04 ± 0.38Cc	2.81 ± 0.00Dd	2.24 ± 0.19Cd	0
	24	8.12 ± 0.24Bb	4.94 ± 0.06Bc	3.22 ± 0.07Bc	44
	48	8.68 ± 0.21Bb	3.54 ± 0.00Cc	5.18 ± 0.15Aa	131
	72	10.92 ± 0.44Aa	6.36 ± 0.12Aa	4.62 ± 0.05Ab	106
未灭菌	0	3.64 ± 0.24Cc	3.43 ± 0.19Aa	0.24 ± 0.03Cc	0
	24	3.64 ± 0.08Cc	1.89 ± 0.10Bb	1.75 ± 0.03Bb	630
	48	5.04 ± 0.12Bb	1.54 ± 0.14Bc	3.54 ± 0.36Aa	1 359
	72	5.32 ± 0.13Aa	1.82 ± 0.03Bb	3.50 ± 0.11Aa	1 359

注:同列数据后不同小写字母、大写字母分别表示差异显著( $P<0.05$ )、极显著( $P<0.01$ )。表 2、表 3、表 4 同。

值,48 h 后呈降低趋势,这与李全丰等的研究结论<sup>[8]</sup>相似。试验结果表明,黑曲霉对灭菌、未灭菌的棉籽粕蛋白均有降解作用,且小分子肽氮含量显著提高。

2.2 假丝酵母发酵前后棉籽粕产品的蛋白质特性

由假丝酵母发酵前后棉籽粕产品的蛋白质特性(表 2)可知,假丝酵母发酵棉蛋白后,酸溶蛋白总氮含量、小肽氮含量、小肽氮提高率均高于发酵前,而游离氨基氮则呈降低趋势,与

黑曲霉发酵棉粕游离氨基氮的趋势相反。试验结果表明,假丝酵母具有降解大分子棉蛋白的作用。

2.3 米曲霉发酵前后棉籽粕产品的蛋白质特性

由米曲霉发酵前后棉籽粕产品的蛋白质特性(表 3)可知,米曲霉发酵棉蛋白后,酸溶蛋白总氮含量、小肽氮含量均高于发酵前,并随发酵时间的推移呈上升趋势,但发酵 48 h 后呈下降趋势;发酵棉蛋白的游离氨基氮较发酵前均减少。

表 2 假丝酵母发酵前后棉籽粕蛋白质特性

灭菌与否	时间 (h)	酸溶蛋白总氮 (mg/g)	游离氨基氮 (mg/g)	小肽氮含量 (mg/g)	小肽氮提高率 (%)
灭菌	0	5.04 ± 0.29Bc	2.81 ± 0.14Aa	2.24 ± 0.13Cd	0
	24	7.00 ± 0.45Aa	2.10 ± 0.05Bb	4.90 ± 0.38ABb	119
	48	5.60 ± 0.18Bb	1.40 ± 0.03Cc	4.20 ± 0.06Bc	88
	72	7.00 ± 0.22Aa	1.40 ± 0.03Cc	5.60 ± 0.41Aa	150
未灭菌	0	3.64 ± 0.17Bb	3.43 ± 0.20Aa	0.24 ± 0.01Dd	0
	24	2.80 ± 0.00Cc	1.05 ± 0.08Dd	1.75 ± 0.01Cc	630
	48	3.64 ± 0.07ABb	1.49 ± 0.00Cc	3.15 ± 0.00Aa	1 213
	72	3.92 ± 0.04Aa	1.82 ± 0.05Bb	2.10 ± 0.00Bb	776

表 3 米曲霉发酵前后棉籽粕蛋白质特性

灭菌与否	时间 (h)	酸溶蛋白总氮 (mg/g)	游离氨基氮 (mg/g)	小肽氮含量 (mg/g)	小肽氮提高率 (%)
灭菌	0	5.04 ± 0.19Cd	2.81 ± 0.12Aa	2.24 ± 0.01Cd	0
	24	5.32 ± 0.00Cc	1.40 ± 0.02Cc	3.92 ± 0.00Bc	75
	48	7.00 ± 0.09Aa	1.40 ± 0.07Cc	5.60 ± 0.31Aa	150
	72	6.44 ± 0.21Bb	2.10 ± 0.10Bb	4.34 ± 0.01Bb	140
未灭菌	0	3.64 ± 0.12Cd	3.43 ± 0.19Aa	0.24 ± 0.03Dd	0
	24	4.76 ± 0.00Ab	3.36 ± 0.09Aa	1.40 ± 0.04Cc	484
	48	5.04 ± 0.12Aa	1.54 ± 0.00Bb	3.50 ± 0.00Aa	1 359
	72	4.48 ± 0.16Bc	1.33 ± 0.02Cc	3.15 ± 0.03Bb	1 213

2.4 混菌发酵前后棉籽粕产品的蛋白质特性

由混菌发酵前后棉籽粕产品的蛋白质特性(表 4)可知,混合菌种发酵棉蛋白后,酸溶蛋白总氮含量、小肽氮含量均高于发酵前,并随发酵时间的推移呈上升趋势,但发酵 48 h 后呈降低趋势;混菌发酵棉蛋白的小分子肽氮含量最佳,而游离氨基氮均低于发酵前。试验结果表明,混菌发酵降解棉粕大分蛋白的效果优于单菌种发酵。

2.5 不同菌种降解棉粕产生小分子肽的效果

由不同菌种降解棉粕大分子蛋白质产生小分子肽的效果(图 1、图 2、表 5)可知,采用 3 种菌株及其混合菌液发酵处理

均可不同程度降解棉粕大分子蛋白质,且灭菌发酵与未灭菌发酵的变化趋势相似,除假丝酵母菌外,多以发酵 48 h 产生的小分子肽氮含量最多。然而菌种之间仍存在差异,以混菌发酵产生的小肽氮含量提高最为明显,可见菌株混合发酵对降解棉粕大分子蛋白质具有“协同效应”,这与诸葛斌等的研究结论<sup>[2,4]</sup>一致。对单菌种的发酵效果进行比较,米曲霉最佳,黑曲霉次之,假丝酵母最差。

3 结论与讨论

棉粕是优质蛋白质原料之一,尤其在我国主要产棉地区。

表 4 混菌发酵前后棉籽粕蛋白质特性

时间 (h)	灭菌发酵棉蛋白				未灭菌发酵棉蛋白			
	酸溶蛋白总氮 (mg/g)	游离氨基氮 (mg/g)	小肽氮含量 (mg/g)	小肽氮提高率 (%)	酸溶蛋白总氮 (mg/g)	游离氨基氮 (mg/g)	小肽氮含量 (mg/g)	小肽氮提高率 (%)
0	5.04 ± 0.38C	2.81 ± 0.02A	2.24 ± 0.09D	0	3.64 ± 0.08C	3.43 ± 0.02A	0.24 ± 0.01C	0
24	7.28 ± 0.18AB	2.10 ± 0.11BC	5.18 ± 0.01B	131	4.76 ± 0.00B	3.01 ± 0.08B	1.75 ± 0.06B	630
48	8.12 ± 0.59A	1.75 ± 0.04C	6.37 ± 0.05A	185	5.32 ± 0.08A	1.75 ± 0.05D	3.50 ± 0.21A	1 359
72	7.00 ± 0.39B	2.28 ± 0.06B	4.72 ± 0.17C	111	4.76 ± 0.22B	2.28 ± 0.02C	3.15 ± 0.05A	1 213

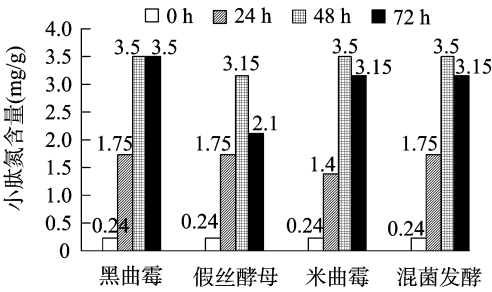


图1 未灭菌发酵小肽氮含量

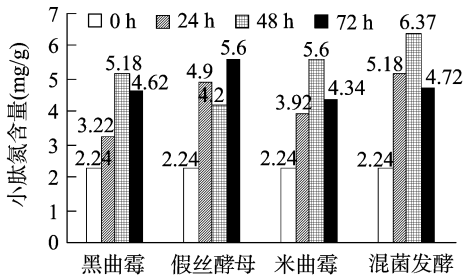


图2 灭菌发酵小肽氮含量

表 5 不同菌种降解棉粕大分子蛋白质产生小分子肽的效果

发酵时间 (h)	小肽氮含量(mg/g)							
	黑曲霉		假丝酵母		米曲霉		混合菌种	
	未灭菌	灭菌	未灭菌	灭菌	未灭菌	灭菌	未灭菌	灭菌
0	0.24	2.24	0.24	2.24	0.24	2.24	0.24	2.24
24	1.75	3.22	1.75	4.90	1.40	3.92	1.75	5.18
48	3.50	5.18	3.15	4.20	3.50	5.60	3.50	6.37
72	3.50	4.62	2.10	5.60	3.15	4.34	3.15	4.72

然而,产棉地区棉粕在畜禽饲料中的利用比例有限,这与棉粕游离棉酚的毒性、棉蛋白的吸收利用率有关。采用有益菌株发酵法降解不易被利用的棉粕大分子蛋白,提高可直接吸收利用的小肽含量,已成为提高棉蛋白消化吸收利用率的一种有效方法。本试验选用 3 种工业微生物标准菌种及其混合菌液固体发酵处理棉粕,酸溶蛋白总氮、小分子肽含量均大幅提高。综合分析表明,3 个菌株混合发酵的效果最佳,小分子肽氮可提高至 6.37 mg/g(若蛋白系数取 6.25,小肽含量可提高 3.98%),比诸葛斌等的试验结果<sup>[2,9]</sup>低,而比李旺军等的试验结果<sup>[10]</sup>高,这可能与发酵选用的菌株和发酵底物有关。本试验以单一棉粕为发酵底物,比较灭菌发酵与未灭菌发酵对

降解棉粕大分子蛋白的效果。结果表明,发酵前未灭菌棉粕的小肽氮含量很低,仅为 0.24 mg/g,而高温灭菌使小肽氮含量提高至 2.24 mg/g;高温灭菌使酸溶蛋白总氮增加,而使游离氨基氮降低,可能由于高温灭菌使部分大分子蛋白质肽键断裂而形成小分子肽,因游离氨基酸发生“美拉德反应”导致游离氨基氮减少。比较灭菌与未灭菌发酵对小肽氮提高率的影响可知,未灭菌发酵降解棉粕大分子蛋白质的效果优于灭菌发酵,但灭菌发酵的小肽氮含量较高。

试验采用 3 株标准菌种对棉粕发酵处理,均有降解大分子棉蛋白的作用,且混合菌株发酵表现出“协作效应”。由反映发酵棉蛋白特性的酸溶蛋白总氮、游离氨基氮、小肽含量可知,单菌株及混合菌株的发酵处理时间以 48 h 为宜。

参考文献:

[1] 贾晓锋,李爱科,姚军虎,等. 固态发酵对棉籽粕棉酚脱毒及蛋白降解的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2009(3): 49-54.

[2] 诸葛斌,刘俊,方慧英,等. 混菌发酵改良棉粕蛋白工艺及协同作用研究[J]. 中国生物工程杂志,2011,31(9):62-68.

[3] 邱良伟,李爱科,程茂基,等. 两种不同发酵工艺的棉籽粕营养价值研究[J]. 饲料工业,2012,33(13):32-36.

[4] 徐晶,陈光,刘国明,等. 不同菌株固态生料发酵棉籽粕的研究[J]. 中国油脂,2012,37(7):16-19.

[5] Sun H, Tang J W, Yao X H, et al. Improvement of the nutritional quality of cottonseed meal by bacillus subtilis and the addition of papain[J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2012, 14(4):563-568.

[6] Sun H, Yao X H, Wang X, et al. Chemical composition and in vitro antioxidant property of peptides produced from cottonseed meal by solid-state fermentation[J]. CyTA-Journal of Food, 2015, 13(2): 264-272.

[7] GB 14771—1993 大豆肽粉行业标准[S].

[8] 李全丰,程茂基,王彩玲,等. 固态生料发酵棉籽蛋白制备小肽研究[J]. 饲料工业,2011,32(6):34-37.

[9] 郭德斌,付桂明,吴学华,等. 响应面法优化复合菌种发酵棉粕工艺条件[J]. 粮油加工,2010(3):68-72.

[10] 李旺军,方华,夏佳吉,等. 多菌种固态发酵对豆粕、棉籽粕和花生粕组成的混合蛋白原料的影响[J]. 粮食与饲料工业,2011(8):49-52.